

Aus der Augenklinik der Universität
Erlangen-Nürnberg
(Direktor: Prof. Dr. E. Schreck)

Hemmung von Epithelregeneration und cornealer Wundheilung beim Kaninchen durch Antimetaboliten

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Friedrich-Alexander-Universität
zu
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
WOLF KYPKE
aus Stettin

1967

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg

Dekan: Professor Dr. med. K. G. O b e r

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. J. Wollensak

Tag der mündlichen Prüfung: 17. März 1967

Aus der Augenklinik der Universität Erlangen-Nürnberg
(Direktor: Prof. Dr. E. SCHRECK)

Hemmung von Epithelregeneration und cornealer Wundheilung beim Kaninchen durch Antimetaboliten

Von

J. WOLLENSAK und W. KYPKE

Mit 7 Textabbildungen



A. Einleitung

Seit der Einführung von Antimetaboliten in die Therapie des Herpes corneae finden sich neben Mitteilungen guter Verträglichkeit und schwankender Therapieerfolge auch Berichte über Schädigungen der Hornhaut. Zur Diskussion steht, ob letztere durch Antimetaboliten oder durch Superinfektionen ausgelöst werden.

WOLLENSAK (1960) berichtete über einen Verlust des Hornhautepithels bei Anwendung von para-Fluor-Phenylalanin (FPA) zur Therapie des Herpes der Hornhaut. Schon bald nach der Einführung eines weiteren Antimetaboliten, des 5-jodo-2'-deoxyuridin (IUDR) in die Herpestherapie gelangten schwere Komplikationen von seiten der Hornhaut zur Beobachtung. Diese reichen von intensiver Eintrübung der Hornhautschichten (BURNS 1963, REISER 1963) bis zur Hornhautperforation (DE ROSA 1962, NORDMANN 1964, GÜNTHER 1964, PAYRAU 1964, WOLLENSAK et al. 1964). Den meisten Literaturberichten zufolge soll IUDR im Tierexperiment keinen Einfluß auf die gesunde Hornhaut ebenso wie auf die corneale Wundheilung nehmen (KAUFMAN 1962, LAIBSON et al. 1963, GRAEBER 1964, KÜCHLE 1964). Nur PAYRAU (1964) berichtete über eine Verzögerung unter IUDR-Einwirkung.

In diesem Zusammenhang sollten eigene Untersuchungen an der Kaninchenhornhaut zeigen, ob derartige Substanzen die Epithelregeneration und die corneale Wundheilung zu hemmen vermögen. Um hierbei Vergleiche mit den klinischen Beobachtungen anstellen zu können, finden möglichst therapeutische Dosen Verwendung.

B. Experimentelle Untersuchungen

Dem Versuch dienten 1,5—3 kg schwere, 1—2-jährige Kaninchen.

1. Versuche zur Epithelregeneration

24 Std vor der Abrasio des Hornhautepithels lokale Applikation von Antimetaboliten, jeweils bestehend aus FPA, IUDR und Cortison-Augensalbe „Hoechst“. Die Verabreichung der Tropfen erfolgte tagsüber stündlich, nachts zweistündlich

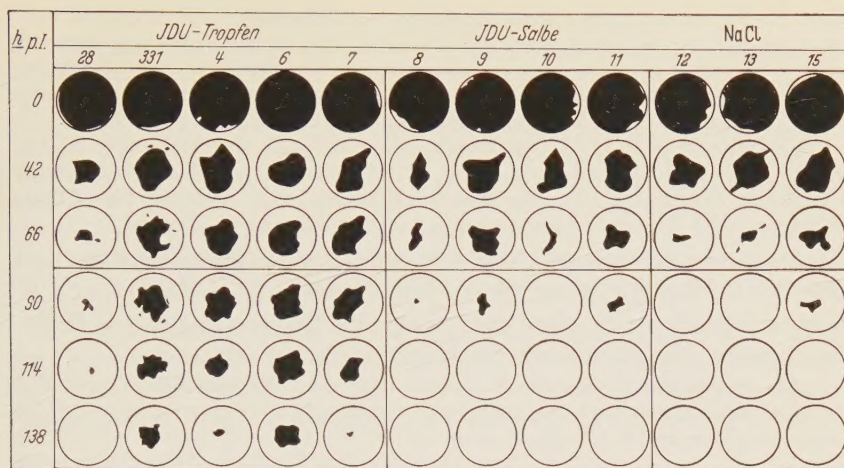


Abb. 1a. Darstellung der Versuche zur Epithelregeneration. Fluoresceinpositive Stellen schwarz. Limbus corneae als Kreis eingezeichnet. Ausgangssituation nach Abrasio corneae in der obersten Reihe dargestellt. Kenn-Nummer der Tiere durch die zweite Zeile oben markiert. Stunden der Behandlung und Kontrollen durch die senkrechte Zahlenreihe am linken Rand gekennzeichnet. Die horizontale Linie gibt das Ende des Versuches wieder

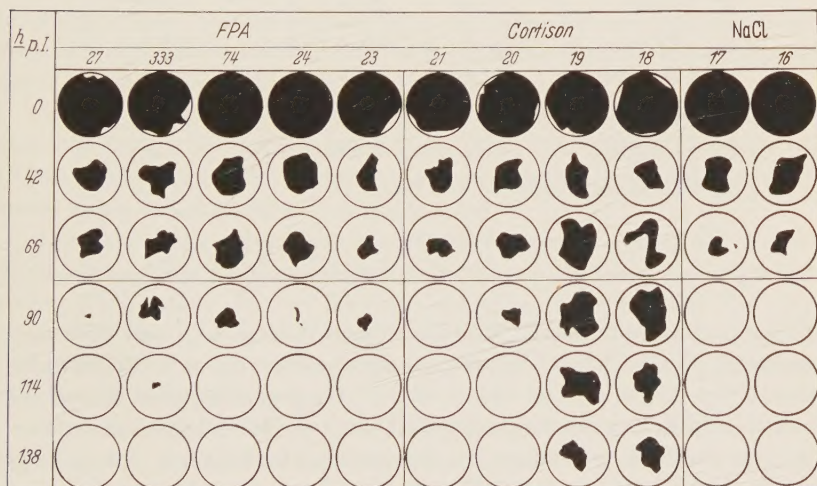


Abb. 1b. Darstellung der Versuche zur Epithelregeneration. Legende vgl. mit Abb. 1a. Die lokale Applikation von Cortison „Hoechst“ führt bei Tier 18 und 19 zu einer Infektion und verzögerten Abheilung (s. Text)

in den Bindehautsack, die der entsprechenden Salben tagsüber und nachts zweistündlich. Nach der Epithelabrasio Fortsetzung des Versuchs über weitere 72 Std. Die Kontrolltiere erhielten in gleichen Zeitabständen physiologische Kochsalzlösung instilliert. Den Tropfen wurden Streptomycin 1,7 mg/ml und Penicillin 1700 E/ml zugesetzt. Die Abrasio des Hornhautepithels erfolgt nach Cocainanaesthesie mit

dem Hockeymesser, wobei unter Kontrolle von Fluorescein auf möglichst vollständige Entfernung des Epithels geachtet wird. Die Ausgangssituation kann der Abb. 1, oberste Reihe entnommen werden. Der Verlauf der Abheilung wird durch regelmäßige Anfärbung mit Fluorescein alle 4 Std verfolgt. Sämtliche mit Antimetaboliten behandelten Tiere unterliegen einer bakteriologischen Kontrolle.

Geprüft wurden: 0,1% IUDR-Tropfen (Emanil Op. 13, Hoechst); 0,1% IUDR-Salbe (Emanil Op. 3, Hoechst); 0,3% FPA-Tropfen DL-para-Fluorphenylalanin (California Corporation for Biochemical Research, Los Angeles, Lot 920751, Nitrogen 7,77% Chromat. homogeneus); Cortison-Augensalbe „Hoechst“, 1%.

Ergebnisse der eigenen Untersuchungen. Die Ausgangssituation und der Verlauf der Abheilung finden ihre Darstellung in Abb. 1a und b. Hierbei bezeichnen die schwarzen Stellen die fluoresceinpositiven Hornhautpartien, der Tuschekreis die Hornhaut-Lederhaut-Grenze.

Am raschesten heilen die Kontrollaugen ab. Ihr Mittelwert liegt bei 80 Std (vgl. Tabelle 1). Die mit FPA getropften Tiere benötigen zur

Tabelle 1

	Behandlung	Augen n	Mittlere Abheilungszeit (h)	Mittlere Abweichung vom Durchschnitt(h) σ
A	NaCl	5	$80 \pm 11,5$	$\pm 5,2$
B	FPA	5	$102,4 \pm 15,2$	$\pm 6,4$
C	IUDR-Salbe . .	4	$99 \pm 14,3$	$\pm 7,0$
D	IUDR-Tropfen .	5	$149 \pm 11,8$	$\pm 5,0$
E	Cortison . . .	4	s. Text	—

Signifikant verschieden: A von B und D

B von A und D

C von D

D von A, B und C

Abheilung durchschnittlich 102,4 Std, einer Verzögerung von 27% entsprechend. Vergleichbare Abheilungszeiten weisen die mit IUDR-Salbe behandelten Augen auf, im Mittel 99 Std. Hingegen liegt der Mittelwert der mit IUDR-Tropfen behandelten Tiere bei 149 Std, was einer Verzögerung von 80% gegenüber den Kontrollen gleichkommt. Somit zeigt sich ein deutlich ausgeprägter Unterschied der Regenerationszeiten von FPA und IUDR-Salbe einerseits und IUDR-Tropfen andererseits.

Keine sichere Aussage kann man aufgrund der Versuche mit Cortison treffen, da trotz Antibioticazusatz 2 Tiere dieser Versuchsgruppe eine Infektion mit Staphylococcus albus bekamen. Unter den genannten Versuchsbedingungen scheint die Epithelregeneration aber kaum merklich gestört.

2. Versuche zur cornealen Wundheilung

Nach Injektion von 0,3—0,5 g Urethan (20%ig) pro Kilogramm Körpergewicht in eine Ohrvene und lokaler Anaesthetie durch 10%iges Cocain stanzt man mit einem 6 mm-Trepan (Modell von CASTROVIEJO) die Hornhaut des rechten Auges bis zu einer Tiefe von 0,2 mm aus. Lamelläre Abtragung erfolgt mit dem Hockey-messer unter Anfärbung durch Fluorescein. 2 Std nach der Entfernung der zentralen Hornhautpartien werden jeweils 5 Tiere lokal mit IUDR-Tropfen und 4 mit physiologischer Kochsalzlösung getropft. 4 weitere Tiere bleiben ohne Tropfenbehandlung. Die Applikation der Tropfen erfolgt tagsüber stündlich, nachts zweistündlich. Ab der zweiten Nacht legt man zwischen 23 und 7 Uhr eine Pause ein. Nach Abheilung der Kontrollaugen wird der über 120 Std (5 Tage) fortgesetzte Versuch abgebrochen.

Bei einer weiteren Gruppe von Tieren setzt die Behandlung erst 24 Std nach der Verletzung ein. Hierbei erhielten 4 Kaninchen physiologische Kochsalzlösung, 4 IUDR-Tropfen lokal. Die Beobachtung der Abheilung geschieht unter Spaltlampenkontrolle und Anfärbung durch Fluorescein; letzteres nach 48 Std in vierstündlichen Abständen. 1 bzw. 3 Wochen nach Beginn der Versuche erfolgt eine histologische Kontrolle der Hornhautbefunde.

Ergebnisse. Nach spätestens 4 Tagen, im Mittel nach 82 Std (Tabelle 2) sind die unbehandelten Kontrollaugen unter Facettenbildung und leichter Narbentrübung abgeheilt, d.h. nicht mehr anfärbbar. Ähnliche Ergebnisse lassen die mit physiologischer Kochsalzlösung getropften Augen erkennen. Die Zeit für die Abheilung liegt im Mittel bei 99 Std. Beide Versuchsreihen liegen mit ihren Mittelwerten statistisch innerhalb der 3σ -Grenze und zeigen somit keine Signifikanz; sie dürfen daher als eine Kontrollgruppe zusammengefaßt werden.

Die mit IUDR-Tropfen behandelten Tiere zeigen eine mittlere Dauer der Abheilung von 244 Std (niedrigster Wert 192 Std), wobei sich bis 48 Std nach Beginn der Therapie der Heilverlauf von den Kontrolltieren kaum unterscheidet.

Jetzt erst kann man eine deutliche Verzögerung sowohl der Parenchym- als auch der Epithelregeneration erkennen. Es bildet sich ein reliefartiger Ulcusgrund, der bei 3 Tieren zusätzlich eine milchige Trübung annimmt (Abb. 2 und 3). Kontrollen auf Bakterien verlaufen negativ. Diese 3 Augen werden 7 Tage bzw. 3 Wochen nach Versuchsbeginn histologisch bearbeitet.

Setzt die Verabreichung von IUDR-Tropfen 24 Std nach der Trepanation ein, so liegt die mittlere Abheilungszeit bei 249 Std. Wie im vorhergehenden Experiment findet sich auch hier eine Hornhaut milchig getrübt. Die Kontrollaugen zeigen mit der vorhergehenden Kontrollgruppe ebenfalls einen vergleichbaren Durchschnittswert von 92 Std. Hieraus läßt sich ableiten, daß die um 24 Std verzögerte lokale Anwendung von IUDR-Tropfen keinen statistisch zu sichernden Einfluß auf die beobachtete Abheilung gewinnt. Somit scheint es erlaubt, beide Versuche zur statistischen Auswertung zusammenzufassen (Tabelle 2).

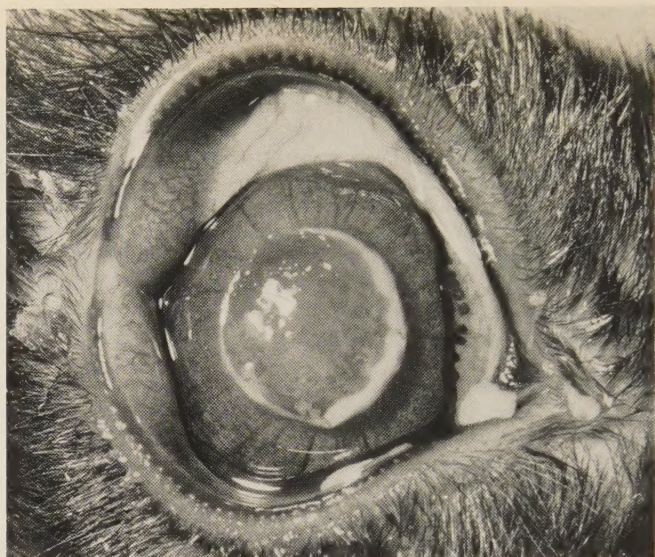


Abb. 2. Versuchstier 3: 6 Tage nach Abtragung einer 0,2 mm tiefen und 6 mm Durchmesser betragenden Hornhautschicht und lokaler Applikation von IUDR-Tropfen

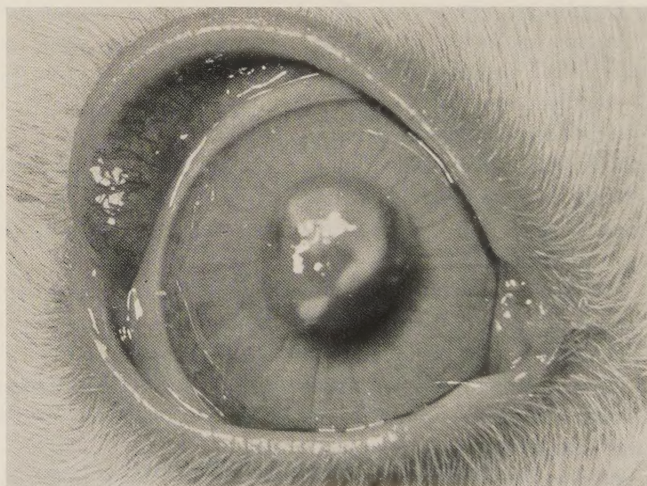


Abb. 3. Versuchstier 6: 3 Wochen nach Versuchsbeginn. Experimentelle Bedingungen wie beim Kaninchen 3 (s. Abb. 2)

Tabelle 2

Behandlung	Augen n	Mittlere Abheilungszeit (h)	Mittlere Abweichung vom Durchschnitt(h) σ
Keine und NaCl .	12	$91 \pm 17,2$	$\pm 5,0$
IUDR-Tropfen .	8	$246 \pm 31,4$	$\pm 11,9$

3. Histologische Untersuchungen

Nach Tötung der Tiere Fixierung der Bulbi in 4%igem Formalin und Einbettung der Hornhäute in Paraffin. Färbung der Schnitte mit Hämatoxylin-Eosin,

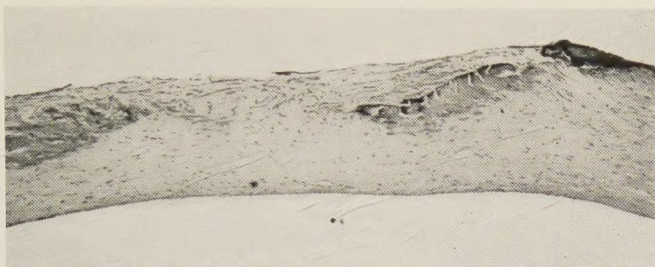


Abb. 4. Histologisches Präparat aus der Hornhaut des Kaninchens 6 (s. Abb. 3). Übersichtsaufnahme, Färbung Hämatoxylin-Eosin. Rechts im Bild fibrinoide Nekrose, links die granuläre Degeneration erkennbar. Teilweiser Verlust des Epithels bei der histologischen Bearbeitung



Abb. 5. Stärker vergrößerter Ausschnitt aus Abb. 4. Die fibrinoide Nekrose unverkennbar dargestellt

nach VAN GIESON, GÖMÖRI, GOLDNER, WEIGERT (Fibrinfärbung) und RINEHART-ABUL-HAJ.

Die histologischen Untersuchungen zur Regeneration des Hornhautepithels alleine unter dem Einfluß von Antimetaboliten bieten keine sichere Abweichung gegenüber den Kontrollen.

Um so aufschlußreicher scheinen die Befunde der cornealen Wundheilung nach lokaler Anwendung von IUDR. Während die 8 Tage nach Versuchsbeginn untersuchte Hornhaut (Abb. 2) keine grundsätzlich unterschiedliche Regeneration des Parenchyms und Epithels gegenüber den Kontrollen aufweist, so zeigen doch die 2 Wochen später unter-

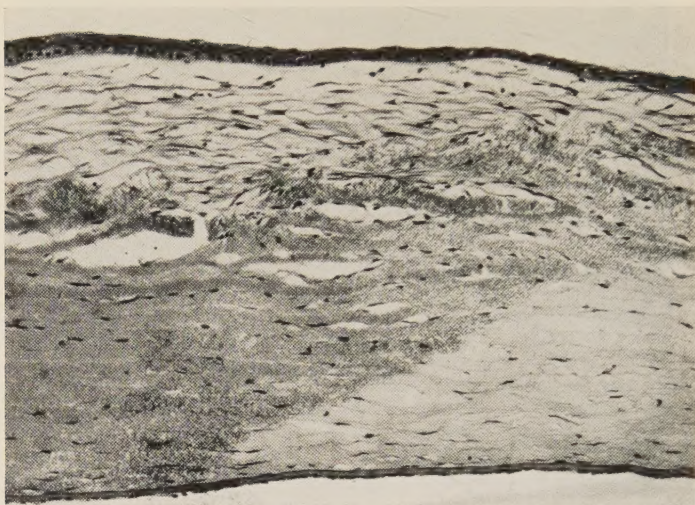


Abb. 6. Darstellung der granulären Degeneration in der Hornhaut des Kaninchens 6 (s. Abb. 3). In den descemetnahen Abschnitten scheint die Abgrenzung gegenüber dem „gesunden Parenchym“ scharf. In den oberen Anteilen der Hornhaut erkennt man eine granuläre Degeneration, die sich nicht nur an die Faserzüge hält, sondern auch die Fibroblasten betrifft



Abb. 7. Stärker vergrößerter Abschnitt aus Abb. 6

suchten beiden Hornhäute (Abb. 3) ein völlig anderes Bild. Neben dem typischen Bild der Epithelregeneration (Abb. 6 und 7) die zu erwartenden Fibroblasten (Abb. 4—7) in den oberflächlich gelegenen Parenchymschichten. In der Randzone des früher ausgestanzten Gewebes sieht

man fibrinoide Nekrosen (Abb. 4 und 5) und vielkernige Zellen. Die bei der Trepanation freigelegten Parenchymschichten zeigen bis zur Descemetschen Membran eine granuläre Degeneration (Abb. 4, 6 und 7) mehr oder minder stark ausgeprägt, wobei die vorgegebene Faserstruktur gut erkennbar bleibt. Degenerierte Faserzüge kann man bis in das offensichtlich noch normale Gewebe hinein verfolgen. Neben dem ortständigen Parenchym zeigen auch immer wieder junge Zellen, die Fibroblasten (Abb. 7), eine granuläre Degeneration. In diesem Zusammenhang bleibt bemerkenswert, daß die Zellkerne nur gelegentlich pyknotisch erscheinen und sich keinerlei leukocytäre Reaktion (Abb. 4, 6 und 7) findet.

C. Diskussion der eigenen Untersuchungen

Ein über mehrere Tage außerhalb mit IUDR behandelter Patient bot bei der Klinikaufnahme eine Keratitis dendritica. Nach Touchierung mit Jodtinktur erfolgte entgegen unserer Erfahrung keine rasche Epithelisierung, sondern es bildete sich ein torpides Ulcus. Von dieser Beobachtung ausgehend, verabreichten wir im ersten Versuch 24 Std vor der Abrasio des Hornhautepithels IUDR-Tropfen lokal. Eine möglichst vollständige Abrasio wurde aus zwei Gründen angestrebt. Nach Mitteilungen aus der Literatur gelangen weniger ausgedehnte Epithelläsionen zunächst fast vollständig durch Zellmigration zur Deckung, während größere Defekte zusätzlich durch Zellteilung abheilen (PETERS 1885, SALZER 1911 und 1912, FRIEDENWALD et al. 1944, BUSCHKE 1949, HEYDENREICH 1958 u.a.). Außerdem war bei einer möglichst vollständigen Abrasio des Hornhautepithels eine genauere Beobachtung zu erwarten.

Die Kontrollaugen heilten in weitgehender Übereinstimmung mit HEYDENREICH (1958) im Mittel nach 80 Std ab. Demgegenüber zeigten die lokal mit IUDR-Tropfen behandelten Augen eine erheblich verzögerte Epithelisierung, welche auch nach statistischen Berechnungen stark signifikant ausfiel. Im Gegensatz hierzu findet sich beim alleinigen Einstreichen von IUDR-Salbe in den Bindehautsack nur eine geringe Verzögerung der Regeneration, welche aber statistisch im Bereich der Zufälligkeit liegt. Ähnliche Ergebnisse zeigte auch die FPA-Applikation, wenngleich man hier noch eine Signifikanz bei der Berechnung der 3 σ -Grenze erkennen kann.

Für die Erklärung der unterschiedlichen Wirkung von IUDR-Tropfen und IUDR-Salbe auf die Epithelregeneration stehen mehrere Möglichkeiten zur Diskussion.

Neben einer pflegenden Wirkung der Salbengrundlage bleibt der Zusatz von Bepanthen zu beachten. Letzteres gewinnt durch seinen

Gehalt an Pantothensäure einen günstigen Einfluß auf den Zellstoffwechsel (THIEL und WACKER 1962). Die weniger häufige Verabreichung der Salben gegenüber den Tropfen dürfte kaum eine wesentliche Rolle spielen, da nach Literaturberichten bei Infektionen durch Herpes-Viren die Salbenapplikation vergleichbare Ergebnisse liefert wie die Tropfenanwendung. Schließlich dürften in diesem Zusammenhang Untersuchungen von COGAN und KINSEY (1942) eine gewisse Bedeutung gewinnen. Danach scheint das intakte Epithel besser für fettlösliche Substanzen permeabel, das verletzte für wasserlösliche Verbindungen. So fanden auch FRIEDENWALD und BUSCHKE (1944), GUNDERSON und LIEBMAN (1944) sowie SMELSER und OCANICS (1945), daß verschiedene Anaesthetica in Salbenform auf das verletzte Epithel gebracht, einen viel geringeren Effekt auf Mitose und Zellmigration ausübten als in wasserlöslicher Form. Die eigenen Untersuchungen erlauben keinen Hinweis, welchem der genannten Faktoren hierbei eine ausschlaggebende Bedeutung zukommt.

Wichtig erscheint ferner die Beobachtung, daß eine unterschiedliche Epithelregeneration erst 48—60 Std nach der mechanischen Abrasio eintritt, d.h. bis zu diesem Zeitpunkt zeigten die Kontrollen und die mit Antimetaboliten behandelten Augen dieselbe Heilungstendenz. Obgleich die Antimetaboliten nach 96 Std abgesetzt wurden, kam es im Mittel bei FPA nach 102, bei IUDR-Tropfen erst nach 149 Std zur Abheilung, während sich bei den Kontrollen des Epithels nach 80 Std geschlossen hatte.

Die Ausstanzung des Hornhautgewebes mit dem 6 mm-Trepan bis zu einer Tiefe von 0,2 mm geschah in der Absicht, eine Information gleichzeitig über die Parenchym- und Epithelregeneration zu erhalten. Während sich die Kontrollaugen im Mittel nach 91 Std unter Facettenbildung und geringer Narbentrübung epithelisierten, benötigten die mit IUDR-Tropfen lokal behandelten Tiere eine mittlere Abheilungszeit von 246 Std. Berücksichtigt man hierbei den relativ kleinen Epitheldefekt — im Vergleich zu der fast vollständigen Abrasio —, so scheint nicht nur die mittlere Abheilungszeit der Kontrolltiere, sondern vor allem die der mit IUDR-Tropfen behandelten Tiere außerordentlich bemerkenswert. Hinzu kommt, daß während der lokalen Applikation der Tropfen von 120 Std wohl die Kontrollen abheilten, die mit IUDR behandelten Tiere aber über weitere 120 Std bzw. 5 Tage ein Ulcus aufzeigten. Sie benötigten also nach Absetzen des Antimetaboliten noch einmal denselben Zeitraum zur Abheilung wie die Kontrollen. Somit ergibt sich eine Verzögerung, die weit über die der alleinigen, möglichst vollständigen Epithelabrasio hinausgeht. Hieraus darf man folgern, daß auch das Parenchym der Cornea in seiner Reparation deutlich durch IUDR-Tropfen gehemmt wird.

D. Vergleich der eigenen Ergebnisse mit denen der Literatur

In einer gewissen Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen steht eine Mitteilung von PAYRAU (1964), wonach unter IUDR die Narbenbildung der Hornhaut verzögert erscheint. Aufgrund klinischer Beobachtungen äußerten weitere Autoren (CORRIGAN et al. 1962, LUNTZ et al. 1963, ZINTZ et al. 1963, WOLLENSAK 1960) den Verdacht, daß die Epithelregeneration bzw. die Wundheilung der Hornhaut durch Antimetaboliten beeinträchtigt würde.

Eine Hemmung der Zellteilung in der Gewebekultur fanden TAMM und EGGERS (1963) bei einer 10^{-7} -molaren Lösung von FUDR. Ebenso fanden sie eine schädliche Wirkung von BrUDR und IUDR in Abhängigkeit von ihrer Konzentration, wobei die virostatistische Wirkung etwas früher als die Hemmung der Zellvermehrung einsetzte. EY et al. (1964) berichteten über Versuche an Kaninchen-Nierenzellen-Gewebekulturen, wobei IUDR die Zellvermehrung und die Virusproduktion im selben Ausmaß hemmen soll. GNÄDINGER et al. (1964) teilten kürzlich mit, daß Gewebekulturen der Kaninchenhornhaut bei „therapeutischen Dosen“ von IUDR (bis zu 0,1 %) keine Hemmung gegenüber unbehandelten Kontrollen erfahren. Da den Kulturen Embryonalextrakt zugesetzt war, liegt es nahe, daß wesentlich mehr normale Basen zur Verfügung standen als die basenanaloge Verbindung IUDR.

LAIBSON et al. (1963), FOCOSI et al. (1963), GRAEBER (1964) und KÜCHLE (1964) fanden in ihren Experimenten keinen Einfluß auf die Epithelregeneration.

Die scheinbaren Widersprüche zu unseren Ergebnissen bedürfen der näheren Analyse. LAIBSON et al. (1963) begrenzten mittels Trepan eine 6 mm im Durchmesser betragende, zentrale Hornhautpartie und abradierten dessen Epithel vorsichtig. Es fällt nun auf, daß auch in den Kontrollen die Abheilungszeit bis zu 6 Tagen betrug. Dies steht nicht im Einklang mit Literaturberichten (ULLERICH 1953, HEYDENREICH 1958, GRAEBER 1964) und den eigenen Versuchen. Danach wäre eine Abheilungszeit von etwa 48–60 Std zu erwarten gewesen. LAIBSON et al. (1963) fanden weiter, daß die Abheilungsdauer unter IUDR bis zu 8 Tagen betrug. Nachdem sowohl den Kontrollen als auch dem IUDR Merthiolat (Thimerosal, 1:50000) zugesetzt war, liegt der Verdacht nahe, daß diese außerordentlich bakteriostatisch wirkende Quecksilberverbindung das abweichende Ergebnis lieferte.

FOCOSI et al. (1963) entblößten zentral einen 4 mm, GRAEBER (1964) einen 6 mm im Durchmesser betragenden Hornhautbezirk von Epithel. Die von GRAEBER ermittelten Abheilungszeiten lagen zwischen 36 und 48 Std und damit fast alle innerhalb des von ULLERICH und DURCHSCHLAG (1953) ermittelten Normalbandes der Epithelisierung. Aus den eigenen Versuchen geht eindeutig hervor, daß in den ersten 50 Std der

IUDR-Applikation noch keine sichere Hemmung gegenüber den Kontrollen eintritt. Dieses Ergebnis bestätigt somit indirekt die Versuche von FOCOSI et al. und GRAEBER. Übrigens weisen die Versuche des Letzteren darauf hin, daß die Hemmung der Epithelregeneration um den 48 Std-Wert einsetzt, da 2 seiner 10 IUDR-Versuche etwas aus dem Kollektiv der Kontrollen herausfallen.

KAUFMAN (1962) prüfte die Regeneration nur nach Scarifikation der Hornhaut. KÜCHLE (1963) untersuchte die Hornhäute zu einem Zeitpunkt histologisch (13. Tag) an dem auch wir noch keine Besonderheiten fanden.

Die eigenen Untersuchungen liefern somit einen experimentellen Hinweis zur Klärung der nach IUDR-Applikation berichteten Komplikationen. Letztere reichen von ausgedehnten Parenchymtrübungen und Einschmelzungen der Hornhaut bis zur Hornhautperforation (DE ROSA 1962, vgl. WOLLENSAK 1964). Neben der eindeutigen Hemmung von Epithel- und Parenchymregeneration dürfte zusätzlich eine Therapieresistenz von Herpes simplex-Viren (WOLLENSAK et al., nicht veröffentlicht, 1964) und das oft schon durch die herpetische Infektion vorgeschädigte Gewebe eine Rolle spielen. So wird beim Vorliegen eines therapieresistenten Stammes die Zelle durch den Antimetaboliten zusätzlich „geschädigt“.

Schließlich finden die klinischen und experimentellen Beobachtungen sowie unsere Vorstellungen über den Einbau basenanaloger Verbindungen in die DNS der Zelle eine gewisse Bestätigung durch die histologischen Befunde. Die beobachtete Verzögerung der Wirkung und die weit über den Zeitraum der lokalen Anwendung hinaus reichende Beeinflussung der Proteinsynthese kommen möglicherweise in der fibrinoiden Nekrose und der granulären Degeneration des histologischen Präparates zum Ausdruck. Sie zeigen sich keineswegs am Ende der nur über wenige Tage reichenden lokalen Applikation von IUDR, sondern erst Tage bis Wochen hernach. Außerdem bleibt zu bedenken, daß 4 von 8 im Versuch stehenden Tieren die Hornhautkomplikationen bei der gewählten Versuchsanordnung erkennen ließen. Ferner sollte in diesem Zusammenhang daran erinnert werden, daß nach BEN-PORAT et al. (1962) die Basen Thymin-Adenin je etwa 13%, Guanin-Cytosin je etwa 37% der DNS des Herpes simplex-Virus ausmachen. Nahezu umgekehrte Verhältnisse zeigen sich beim Vaccine-Virus und in der Milz sowie Leber des Menschen (vgl. BRESCH, 1964). Eine thyminanaloge Verbindung, wie sie IUDR darstellt, dürfte von diesem Standpunkt aus gesehen noch keine optimale Hemmung für das Herpes-Virus bedeuten.

Zusätzlich könnte eine hyperergische Reaktion im Spiele sein. Jedoch liegen hierzu sowohl von seiten der Klinik als auch experimenteller Befunde bis jetzt keine näheren Hinweise vor.

Zusammenfassung

Die vorliegenden Untersuchungen bringen den statistisch gesicherten Hinweis, daß unter den gegebenen experimentellen Bedingungen Para-Fluor-Phenyl-Alanin eine geringe und 0.1%ige IUDR-Tropfen eine ausgeprägte Hemmung auf die Epithelregeneration ausüben. Dies scheint bei Anwendung von 0,1%iger IUDR-Salbe weniger der Fall zu sein. Im histologischen Präparat war gegenüber den Kontrollen kein sicherer Unterschied zu erkennen.

Die lokale Applikation von 0,1%igen IUDR-Tropfen bewirkt eine deutliche Hemmung der cornealen Wundheilung. Ergänzende histologische Untersuchungen lassen erkennen, daß wahrscheinlich der Einbau dieser basenanalogen Verbindung zu fibrinoider Nekrose und granulären Degeneration des Hornhautparenchyms führen.

Anhand der eigenen Experimente wird die vorliegende Literatur kritisch gesichtet. Aus den eigenen Untersuchungen lassen sich Schlüsse für die bei der IUDR-Therapie beobachteten Komplikationen von seiten der Hornhaut ableiten. Neben den früher diskutierten teratogenen oder mutagenen Nebenwirkungen (WOLLENSAK 1963, 1964) finden sich somit erste experimentelle Hinweise für den Einbau von IUDR — bei Anwendung therapeutischer Dosen — in die Hornhaut.

Summary

The above mentioned experiments divulge the statistically supported conclusion, that under the given experimental conditions para-Fluor-phenylalanine exercises a small and 0.1% IDU solution a definite inhibition on the regeneration of the corneal epithelium. This appears to be less so with the use of 0.1% IDU ointment. There was no definite difference between the histological cut in comparison with the control.

The local application of 0.1% IDU solution causes a distinct inhibition on the healing of corneal wounds. Supplementary histological examinations let one recognize that the assimilation of these basic analogous chemical compounds can lead to fibrinoid necrose and granular degeneration of the corneal stroma.

The literature in question is viewed critically in regard to the experiments mentioned above. From the experiments on the rabbits cornea one can derive conclusions about the observed complication of the IDU therapy on humans. Consequently beside the earlier discussed mutagenous and teratogenous secondary effects (WOLLENSAK 1963 and 1964) one can find experimental conclusions for the assimilation of IDU into the cornea — by the use of therapeutical doses.

Literatur

BEN-PORAT, T., and A. S. KAPLAN: The chemical composition of Herpes simplex and pseudorabies Viruses. *Virology* **16**, 261–266 (1962).

Albrecht v. Graefes Arch. Ophthal. Bd. 168

- BURNS, R. P.: A double blind study of IDU in human herpes simplex keratitis. *Arch. Ophthal.* **70**, 381—384 (1963).
- BUSCHKE, W., J. S. FRIEDENWALD, and W. FLEISCHMANN: Studies on mitotic activity of corneal epithelium. *Methods. Bull. J. Hopk. Hosp.* **73**, 143 (1943).
- BRESCH, C.: *Klassische und molekulare Genetik*. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1964.
- COGAN, D. G., and V. E. KINSEY: Cornea: Physiological aspects. *Arch. Ophthal.* **28**, 661 (1942).
- CORRIGAN, M. J., M. B. GILKES, and D. ROBERTS: Treatment of dendritic corneal ulceration. *Brit. med. J.* **1962 II**, 304.
- ROSA, C. DE: Sul trattamento delle cheratiti erpetiche con la 5-iodo-2-deossiuridina. *Arch. Ottal.* **66**, 411—415 (1962).
- EY, R. C., W. F. HUGHES, A. W. HOLMES, and F. DEINHARD: Clinical and laboratory evaluation of idoxuridine (IDU) therapy in herpes simplex keratitis. *Arch. Ophthal.* **71**, 325—331 (1964).
- FOCOSI, M., G. LEPRI, D. ANDREANI, and F. PARDUCCI: Our present experience with 5-iodo-2'-deoxyuridine (IDU) in ophthalmology. *Ophthalmologica (Basel)* **146**, 199—208 (1963).
- FRIEDENWALD, J. S., and W. BUSCHKE: Influence of some experimental variables on epithelial movements in healing of corneal wounds. *J. cell. comp. Physiol.* **23**, 95 (1944).
- — Mitotic and wound healing activities of corneal epithelium. *Arch. Ophthal.* **32**, 410 (1944).
- GNÄDINGER, M., u. R. ZINTZ: Untersuchungen über die Wirkung von IDU auf Gewebekulturen. *Albrecht v. Graefes Arch. Ophthal.* **167**, 355—366 (1964).
- GRAEBER, W.: Tierexperimentelle und klinische Erfahrungen mit der JUDR-Behandlung des Herpes Corneae. *Klin. Mbl. Augenheilk.* **144**, 75—81 (1964).
- GUNDERSON, T., and S. D. LIEBMANN: Effect of local anesthetics on regeneration of corneal epithelium. *Arch. Ophthal.* **31**, 29 (1944).
- HEYDENREICH, A.: *Die Hornhautregeneration*. Halle: VEB Marhold 1958.
- KAUFMAN, H. E., and L. WEINSTEIN: Clinical cure of herpes simplex keratitis by 5-jodo-2'-deoxyuridine. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **109**, 251—252 (1962).
- KÜCHLE, H. J.: *Fortschritte der medikamentösen Therapie*. Almanach für die Augenheilkunde, S. 209—216. München: J. F. Lehmann 1964.
- , Zur Frage unerwünschter Nebenwirkungen von IDU auf die Hornhaut. *Ber. dtsch. Ophthal. Ges.* **65**, 409—413, 1963.
- , u. B. KUNZE: Erfahrungen mit JUDR (IDU) bei Virusaffektionen der Hornhaut. *Klin. Mbl. Augenheilk.* **144**, 490—503 (1964).
- LAIBSON, P. R., TH. W. SEREY, and J. H. LEOPOLD: The treatment of herpetic keratitis with 5-jodo-2'-deoxyuridine (IDU). *Arch. Ophthal.* **70**, 52—58 (1963).
- LUNTZ, M. H., and F. O. MACCALLUM: Treatment of herpes simplex keratitis with 5-jodo-2'-deoxyuridine. *Brit. J. Ophthal.* **47**, 449—456 (1963).
- NORDMANN, J.: Diskussion. *Ann. Oculist. (Paris)* **197**, 485 (1964).
- PAYRAU, P.: Diskussion. *Ann. Oculist. (Paris)* **197**, 485 (1964).
- PETERS, A.: *Diss.* Bonn 1885.
- REISER, K. A.: Über Hornhautschädigung durch Emanil. S.-B. 108. Vslg. des Vereins Rheinisch-Westfäl. Augenärzte 1963.
- SALZER, F.: Über die Regeneration der Kaninchenhornhaut. *Arch. Augenheilk.* **69**, 272—318 (1911); **70**, 166—184 (1912).
- SMELSER, G. K., and V. OGANICS: Effect of local anesthetics on cell-division and migration following thermal burns of cornea. *Arch. Ophthal.* **34**, 271 (1945).
- Effect of chemotherapeutic agents on cell-division and healing of corneal burns and abrasions in rat. *Amer. J. Ophthal.* **27**, 1063 (1944).

- TAMM, J., and H. J. EGGERS: Specific inhibition of replication of animal viruses. *Science* **142**, 24—33 (1963).
- THIEL, R., u. A. WACKER: Die Behandlung der Keratitis herpetica mit thyminanalogen Verbindungen. *Klin. Mbl. Augenheilk.* **141**, 94—108 (1962).
- ULLERICH, K., u. G. DURCHSCHLAG: Experimentelle Untersuchungen über den Einfluß von Medikamenten auf die Epithelregeneration der Hornhaut. *Klin. Mbl. Augenheilk.* **122**, 705—718 (1953).
- WOLLENSAK, J.: Neuere Gesichtspunkte zur Therapie des Herpes corneae. Tagg der Bay. Augenärzte München 1960. *Klin. Mbl. Augenheilk.* **138**, 588 (1961).
- Antimetaboliten zur Therapie von Viruserkrankungen am Auge. III. Intern. Kongr. für Chemotherapie Stuttgart: Georg Thieme 1964, Volume I, S. 822—828.
- Weitere Erfahrungen mit Antimetaboliten bei Keratitis herpetica (einschließlich IDU). Tagg der Bay. Augenärzte Erlangen 1963. *Klin. Mbl. Augenheilk.* **144**, 617—618 (1964).
- Ergebnisse und Aussichten der Virusforschung für die augenärztliche Therapie. Referat zur 50. Tagg der Württ. augenärztl. Ver. 1964. *Docum. ophthal.* (Den Haag) (im Druck).
- , u. U. KLARE: Untersuchungen zur Therapie der experimentellen Keratitis superficialis herpetica. *Albrecht v. Graefes Arch. Ophthal.* **167**, 214—224 (1964).
- , u. W. KYPKE: (1964) (nicht veröffentlicht).
- ZINTZ, R., u. M. GNÄDINGER: Hornhautzellkulturen mit IDU-Zusatz. *Ber. dtsh. ophthal. Ges.* (im Druck) (1964).
- , u. O. VIVELL: Neue Wege in der Behandlung herpetischer Hornhauterkrankungen. *Ophthalmologica* (Basel) **145**, 320—327 (1963).

Priv.-Doz. Dr. J. WOLLENSAK
 Universitäts-Augenklinik
 852 Erlangen, Universitätsstraße 27

Lebenslauf

Am 5. September 1939 wurde ich als erstes der vier Kinder des Pfarrers Karlheinz Kypke und seiner Ehefrau Elly Kypke in Stettin geboren. Nach der Flucht kam ich 1946 in Weidenbach/Mittelfranken zur Volksschule. Ab Herbst 1950 besuchte ich das Gymnasium, zunächst in Hof, dann in Windsbach und Uffenheim. In Uffenheim legte ich im Sommer 1959 das Abitur ab. Im folgenden Herbst begann ich in Frankfurt das Studium der Soziologie und Philologie, das ich 1960 in Berlin fortsetzte. Im Sommer 1961 wechselte ich zur medizinischen Fakultät und legte im Oktober 1963 an der Freien Universität Berlin das Physikum ab. Die klinischen Semester hörte ich in Lausanne und Erlangen. Hier bestand ich im März 1967 das Staatsexamen.

Ich möchte an dieser Stelle Herrn Professor Dr. med. E. Schreck für die Übernahme des Co-Referates besonders danken.

Herrn Privat-Dozent Dr. med. J. Wollensak spreche ich meinen großen Dank aus, sowohl für die Überlassung des Themas dieser Arbeit als auch für die lebenswürdige Hilfe bei der Einführung in die methodischen Grundlagen, und nicht zuletzt für die materielle Ermöglichung dieser Untersuchungen.

